

< Original Article >

## DNA 교차오염 방지기능이 있는 single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction을 이용한 돼지생식기호흡기증후군바이러스 유전형 감별진단

정필수<sup>1</sup> · 박수진<sup>1</sup> · 김은미<sup>1,2</sup> · 박지영<sup>1,4</sup> · 박유리<sup>1</sup> · 강대영<sup>1,4</sup> · 차현욱<sup>3</sup> · 이경기<sup>4</sup> · 김성희<sup>4</sup> · 박최규<sup>1\*</sup>  
경북대학교 수의과대학 & 수의전염병제어센터<sup>1</sup>, (주) RAD<sup>2</sup>, (주) 나노헬릭스<sup>3</sup>, 농림축산검역본부 질병진단과<sup>4</sup>

### Single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous detection of genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus without DNA carryover contamination

Pil-Soo Jeong<sup>1</sup>, Su-Jin Park<sup>1</sup>, Eun-Mi Kim<sup>1,2</sup>, Ji-Young Park<sup>1,4</sup>, Yu-Ri Park<sup>1</sup>,  
Dae-Young Kang<sup>1,4</sup>, Hyun-Ouk Cha<sup>3</sup>, Kyoung-Ki Lee<sup>4</sup>, Seong-Hee Kim<sup>4</sup>, Choi-Kyu Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center,  
Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>RAD Inc., Daegu 39582, Korea, <sup>3</sup>NANOHELIX Inc., Daejeon 34025, Korea,

<sup>4</sup>Animal Disease Diagnostic Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

(Received 30 May 2016; revised 27 June 2016; accepted 27 June 2016)

#### Abstract

In the study, we developed and evaluated a uracil N-glycosylase (UNG)-supplemented single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction (UsnRT-PCR) assay that can be carried out first-round RT-PCR and second-round nested PCR in a reaction tube without reaction tube opening and can simultaneously detect EU- and NA-PRRSV. The UsnRT-PCR confirmed to have a preventing ability of mis-amplification by contamination of pre-amplified PRRSV DNA from previous UsnRT-PCR. Primer specificities were evaluated with RNAs extracted from 8 viral strains and our results revealed that the primers had a high specificity for both genotypes of PRRSV. The sensitivity of the UsnRT-PCR was 0.1 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL for EU- or NA-PRRSV, respectively, which is comparable to that of previously reported real time RT-PCR (RRT-PCR). Clinical evaluation on 110 field samples (60 sera and 50 lung tissues) by the UsnRT-PCR and the RRT-PCR showed that detection rates of the UsnRT-PCR was 70% (77/110), and was relatively higher than that of the RRT-PCR (69.1%, 76/110). The percent positive or negative agreement of the UsnRT-PCR compared to RRT-PCR was 96.1% (73/76) or 90.9% (30/33), showing that the test results of both assays may be different for some clinical samples. Therefore, it is recommended that diagnostic laboratory workers use the two diagnostic assays for the correct diagnosis for the relevant samples in the swine disease diagnostic laboratories. In conclusion, the UsnRT-PCR assay can be applied for the rapid, and reliable diagnosis of PRRSV without concerns about preamplified DNA carryover contamination that can occur in PCR process in the swine disease diagnostic laboratories.

**Key words :** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction (snRT-PCR), Uracil DNA glycosylase (UNG)

\*Corresponding author: Choi-Kyu Park, Tel. +82-53-950-5973,  
Fax. +82-53-950-5973, E-mail. parkck@knu.ac.kr

## 서 론

돼지 생식기호흡기증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)의 감염에 의해 발생하는 PRRS는 임신모돈의 번식장애와 자돈의 호흡기질병 및 성장부진을 유발하는 질병으로 1987년과 1990년에 북미지역과 유럽지역에서 처음 발생이 확인되었다(Keffaber, 1989; Wensvoort 등, 1991). 이후 PRRS는 양돈업이 성행하는 거의 모든 국가로 확산되었고, 현재 양돈산업에 미치는 경제적 피해가 가장 심각한 질병 중의 하나로 알려져 있다(Albina, 1997; Nuemann 등, 2005). PRRSV는 항원적 및 유전적 특성이 다른 2가지 유전형 즉, Lelystad virus (LV)를 원형으로 하는 유럽형(EU, type 1)과 VR-2332 strain을 원형으로 하는 북미형(NA, type 2)로 구분되며, 과거에는 유전형에 따라 해당 유럽 및 북미지역에서 제한적으로 발생하였지만 최근에는 지역에 상관 없이 유럽, 북미 및 아시아 지역의 양돈장에서 2가지 유전형의 PRRSV가 동시에 유행하고 있어 질병의 진단과 통제에 큰 어려움을 겪고 있다(Murtaugh 등, 2010; Shi 등, 2010).

양돈장의 PRRS 감염을 통제하기 위하여 그간 검사 후 도태, 후보돈 순치, 예방접종, 돈군폐쇄와 같은 다양한 방제전략들이 개발되어 적용되어 왔으며, 최근 예방접종과 돈군폐쇄에 의한 방제전략이 일선 양돈장에서 널리 적용되고 있다(Corzo 등, 2010). 이와 같은 PRRSV 방제전략이 성공하기 위해서는 방제전략의 적용 전·후에 해당 농장의 PRRSV 감염양상과 유전형을 파악하고, 방제전략 적용효과를 분석하는 효과적인 PRRSV 진단법의 활용이 필수적이다(Corzo 등, 2010; Thanawongnuwech와 Suradhat, 2010).

PRRSV의 진단에는 전통적으로 혈청학적 검사와 바이러스 분리동정법을 이용하여 왔으나 혈청학적 검사법은 감염 바이러스의 특성을 파악할 수 없다는 단점이 있고, 바이러스 분리동정법은 검사시간이 많이 소요되며, 야외 사료에서 PRRSV의 유전형을 신속하게 감별할 수 없기 때문에 현장진단용으로는 부적절한 것으로 평가되어 왔다(Kim 등, 1993; Lager 등, 1997). 따라서 최근에는 대부분의 진단실험실에서 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)이나 real time RT-PCR (RRT-PCR)과 같은 유전자진단법을 PRRSV의 진단에 널리 활용하고 있다(Gilbert 등, 1997; Kleiboeker 등, 2005). RT-PCR은 전통적인 바이러스 분리동정법에 비해 신

속, 정확할 뿐만 아니라 PRRSV의 유전형을 감별진단할 수 있는 장점이 있으나 비교적 민감도가 낮기 때문에 1차 RT-PCR의 증폭산물을 이용한 2차 nested PCR을 접목한 nested RT-PCR (nRT-PCR)을 이용하여 낮은 민감도 문제를 해결하였다(Christopher-Hennings 등, 1995; Gilbert 등, 1997; Kono 등, 1996; Shin 등, 1998). 그러나 이러한 nRT-PCR은 RT, 1차 PCR, 2차 nPCR로 구분되는 2~3단계의 핵산 증폭과정을 거치게 되므로 일반 RT-PCR에 비하여 기 증폭된 DNA의 교차오염 가능성이 더 높으며, 이로 인한 오증폭이 큰 문제점으로 지목되고 있다(Aslanzadeh, 2004; Persing, 1990). 한편, RRT-PCR은 PRRSV 유전자에 특이적인 primers와 probe를 이용함으로써 높은 민감도와 특이도를 얻을 수 있고, 검사시료 내의 바이러스 RNA를 정량적으로 분석할 수 있으며, RT-PCR과 달리 결과 판독을 위한 전기영동 과정이 필요하지 않기 때문에 핵산 교차오염의 가능성이 낮은 장점이 있다(Kleiboeker 등, 2005). 그러나 RRT-PCR은 기존 RT-PCR에 비하여 고가의 시약과 장비를 필요로 하기 때문에 일선 진단실험실에서 일상적인 진단법으로 이용하기는 어려운 실정이다. 따라서 대부분의 진단실험실에서는 여전히 RT-PCR이나 nRT-PCR을 일상적인 PRRSV 진단법으로 널리 사용하고 있다.

이 연구에서는 기존 2~3단계로 이루어지는 nRT-PCR의 단점을 개선하고자 1개의 반응튜브에서 1차 RT-PCR과 2차 nested PCR을 연속적으로 수행할 수 있는 single-tube nRT-PCR (snRT-PCR)을 개발하였으며, 더불어 개발 snRT-PCR에 핵산 교차오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있는 uracil N-glycosylase (UNG) 시스템을 적용함으로써 오진의 가능성을 사전에 차단할 수 있는 UNG-supplemented snRT-PCR (UsnRT-PCR)을 개발하여 그 효용성을 검토하였기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 공시바이러스 및 야외시료

유럽형 및 북미형 PRRSV 표준주인 LV 및 LMY strain를 Kim 등(2010)의 방법에 따라 초대 돼지 폐포 대식구(porcine alveolar macrophages, PAM) 또는 MARC-145 cells에 배양하여 시험에 사용하였으며, 특이도 검증을 위하여 2가지 아형의 돼지 인플루엔자 바이러스[A/Korea/103/2009(H1N2) 및 A/Korea/A18/2011

(H3N2)], 돼지열병 바이러스(LOM strain), 돼지파보바이러스(NADL-2 strain) 및 돼지썩코바이러스(PCK0201 strain)를 농립축산검역본부로부터 분양 받아 사용하였다. 야외 시료에 대한 진단법의 검증을 위하여 국내 PRRS 감염농장으로부터 채취한 야외 시료 110점(혈청 60점 및 폐장조직 50점)을 공시하였으며, 공시 바이러스 및 야외시료는 핵산 추출과정에 공시하기 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 핵산 추출

공시 바이러스 및 야외시료의 핵산 추출은 시판 핵산추출키트(Inclonebiotech, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 추천방법에 따라 실시하였다. 즉, 바이러스 배양액과 혈청시료인 경우, 100  $\mu\text{L}$  시료를 핵산추출에 바로 제공하였으며, 조직시료는 세절하여 phosphate buffer saline (PBS)로 10% 유제액을 만든 다음, 조직균질기(Bertin technologies, France)을 사용하여 파쇄하였고, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음, 상등액 100  $\mu\text{L}$ 을 덜어내어 핵산 추출에 사용하였다. 추출된 핵산시료는 50  $\mu\text{L}$ 의 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-처리 증류수에 용해 한 다음,  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 사용하였다.

### snRT-PCR용 primer 설계

snRT-PCR용 primer sets는 2010~2014년 사이에 GenBank에 등록된 국내·외 유럽형 및 북미형 PRRSV의 open reading reading frame (ORF) 7 유전자염기서열 200 여개를 수집한 다음, 유전자 염기서열 분석 프로그램(clone manager 6, Scientific & Educational Software, USA)을 이용하여 가장 안정적인 부위를 선발한 다음, primer 설계 프로그램인 DNASTAR<sup>®</sup>

Lasergene program (DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 유럽형 및 북미형 PRRSV에 특이적인 primer 3종씩 총 6종의 primer를 설계하였다. 각 primer 설계 시에는 이전의 nRT-PCR 개발 보고(Haff 등, 1994; Shin 등, 1998)를 참조하여 1차 RT-PCR용 primer set의 용해점(melting temperature, MT)과 2차 nPCR용 primer set의 MT를  $10^{\circ}\text{C}$  이상 차이나도록 하여 1차 RT-PCR을 실시할 동안 2차 nPCR용 primer set의 작동이 최소화되도록 하였다. 선발된 primer sets를 이용하여 1차 RT-PCR 및 2차 nPCR을 실시할 경우 유럽형의 PRRSV인 경우 406 bp와 336 bp 그리고 북미형 PRRSV인 경우 441 bp와 274 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되도록 하였으며, 설계된 primer sets는 전문회사(Bioneer, Dajeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였다(Table 1).

### RRT-PCR

RRT-PCR은 Kleiboeker 등(2005)의 방법에 따라 one-step PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR kit (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan)와 LightCycler<sup>®</sup> 96 Real-Time PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 실시하였다. RRT-PCR에 사용된 primers와 probes는 PRRSV의 ORF 7과 3'-untranslated region에서 설계된 것으로 특이도가 높아 유럽형 및 북미형 PRRSV를 동시에 감별진단할 수 있으며, PRRSV의 검출 민감도는 약 1 TCID<sub>50</sub>인 것으로 보고되었다. 반응액 조성은 RRT-PCR 용 primers 3종(유럽형, EUF와 EUR; 북미형, NAR) 및 2종의 probes (유럽형 및 북미형)을 각각 0.4  $\mu\text{M}$  씩, primer 2종(북미형, NAF1, NAF2)를 각각 0.2  $\mu\text{M}$  씩 첨가한 후 12.5  $\mu\text{L}$ 의 2x One Step RT-PCR buffer III, 0.5  $\mu\text{L}$ 의 TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ $\mu\text{L}$ ), PrimeScript RT enzyme Mix II, 5  $\mu\text{L}$ 의 추출 핵산을 첨가하였고, DEPC-water를 이용하여 최종 용량

**Table 1.** The primers used in the UNG-supplemented single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction assay

Genotype	Primer name	Sequence (5'-3')	Genome position*	Melting temperature	Product size (bp)
EU	EUF1	GGGGAATGGCCAGCCAGTCAATCA	14648-14671	68.3 $^{\circ}\text{C}$	406
	EUR	TGATCGCCCTAATTGAATAGGTGAC	15029-15053	60.7 $^{\circ}\text{C}$	
	EUF2	CCCAGGGGAGGACAGGC	14718-14734	54.2 $^{\circ}\text{C}$	336
NA	NAF1	GGGGGATGGCCAGCCAGTCAATCA	14927-14950	68.3 $^{\circ}\text{C}$	441
	NAR	CGGTCGCCCTAATTGAATAGGTGAC	15343-15367	60.7 $^{\circ}\text{C}$	
	NAF2	CTAGTGAGCGCAATTGTG	15094-15112	51.4 $^{\circ}\text{C}$	274

\*Nucleotide positions of the UsnRT-PCR primers are numbered according to the sequence of Lelystad virus (GenBank accession number M96262) for EU-PRRSV and LMY strain (GenBank accession number DQ473474) for NA-PRRSV, respectively.

을 25  $\mu$ L로 조정하였다. 반응조건은 42°C에서 10분, 95°C에서 30초 반응 시킨 후 95°C에서 10초, 60°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 40 cycle을 반응시켰다. 검사시료에 대한 RRT-PCR의 반응결과는 매 반응회수별로 형광단위(baseline-corrected normalized fluorescence, dRn)를 측정하여 dRn 값이 0.004 이하( $C_T$  값 37 이상)일 때 음성으로 판독하였으며, 그 이상인 경우 양성으로 판독하였다.

### RT-PCR 및 snRT-PCR

RT-PCR과 snRT-PCR은 시판 Inclone™ One-step RT-PCR Kit (Inclone biotech, Seoul Korea)에 포함된 시약들을 이용하여 제조사의 추천방법에 따라 premix를 제조한 다음, SimpleAmp Thermal cycler (ABI, Foster City, CA)를 이용하여 실시하였다. RT-PCR은, 반응튜브에 Table 1의 RT-PCR용 primer 4종(유럽형, EUF1과 EUR; 북미형, NAF1과 NAR)을 0.4  $\mu$ M씩 첨가한 다음, 1  $\mu$ L의 Enzyme Mix, 12.5  $\mu$ L의 Reaction Mix 및 5  $\mu$ L의 추출 핵산을 첨가하였고, DEPC-water를 이용하여 최종 용량을 25  $\mu$ L로 조정하였다. 반응조건은 50°C에서 30분간 역전사반응을 실시한 후 95°C에서 15분간 처리하였으며 그 후 95°C에서 20초간 denaturation, 55°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 elongation 하는 과정을 35회 연속 실시한 다음, 72°C에서 10분간 최종반응하였다.

snRT-PCR은 전술한 시판키트와 장비를 이용하여 Table 2의 primer 6종을 모두 포함한 premix를 제조하여 실시하되, 1차 RT-PCR에 작동하는 primer 4종(EUR, NAR, UF1 및 NF1)을 농도를 0.04  $\mu$ M로 그리고 2차 nPCR에 작동하는 primer 2종(UF2와 NF2)의 농도를 각각 0.3  $\mu$ M과 0.2  $\mu$ M로 달리하여 snRT-PCR

용 premix를 제조하였다(Haff 등, 1994; Shin 등, 1998). snRT-PCR의 반응조건은 50°C에서 30분간 역전사반응을 실시한 다음, 95°C에서 15분간 처리하였으며, 1차 PCR (95°C에서 30초간 denaturation, 65°C에서 30초간 annealing 및 72°C에서 30초간 elongation)을 15회 실시한 다음, 2차 nested PCR (95°C에서 30초간 denaturation, 45°C에서 30초간 annealing 및 72°C에서 30초간 elongation)을 30회 연속적으로 실시한 다음, 72°C에서 10분간 최종 반응하였다. RT-PCR 및 snRT-PCR 증폭산물은 NEO green 염색액(NEO science, Korea)을 첨가하여 1.5% agarose gel에 전기 영동한 다음, UV trans-illuminator (Bio-Rad, USA)로 특이 밴드를 관찰하여 판독하였다.

### UsnRT-PCR 조건 확립

UNG를 이용한 DNA 교차오염 방지전략은 증폭된 DNA 단편에 포함된 uracil 염기를 제거하는 UNG의 특성을 이용하는 것이므로 PCR을 통하여 증폭된 DNA 염기서열의 deoxythymidine triphosphate (dTTP) 위치에 최대한 deoxyuridine triphosphate (dUTP)가 대체되도록 하여야 한다(Longo 등, 1990). 그러나 PCR premix에 포함되는 dTTP를 dUTP로 완전히 대체할 경우에는 증폭효율이 떨어져 민감도가 저하될 수 있으므로 premix에 포함되는 dTTP와 dUTP의 농도를 적절히 조정할 필요가 있다(Kim 등, 2014; Longo 등, 1990; Pang 등, 1992). 따라서 이 연구에서는 snRT-PCR 용 master mix에 heat labile Cod UNG (ArcticZymes Inc., USA)를 제조사의 추천에 따라 0.5 unit로 첨가하였고, 증폭효율에 영향을 주지 않는 dTTP/dUTP 농도 비를 탐색하기 위하여 앞서 설정한 snRT-PCR용 premix에 dATP, dCTT 및 dGTT의 농도는 2.5 mM로 그

**Table 2.** Comparative sensitivity for the detection of PRRSV by the UNG-supplemented single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction (UsnRT-PCR) and real time RT-PCR (RRT-PCR) on clinical samples

RRT-PCR	UsnRT-PCR				
	Eu positive	NA positive	EU/NA positive	Negative	Subtotal
EU positive	25	-	-	1	26
NA positive	-	35	2	1	38
EU/NA positive	1	1	9	1	12
Negative	2	2	-	30	34
Subtotal	28	38	11	33	110

Percent positive agreement UsnRT-PCR compared to RRT-PCR is 96.1% (73/76), percent negative agreement of UsnRT-PCR compared to RRT-PCR is 90.9% (30/33), and overall percent agreement of UnRT-PCR compared to RRT-PCR is 93.6% (103/110).

대로 유지하되, dTTP/dUTP의 첨가 농도비를 달리하여 2,5/0, 2.0/0.5, 1,5/1,0, 1.0/1.5, 0.5/2.0 및 0/2.5 mM 농도비로 첨가한 premix를 각각 제조하였고, NA-PRRSV ( $10^4 \sim 10^1$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL)로부터 추출한 핵산을 template로 첨가하여 UsnTR-PCR을 실시한 다음, 증폭효율에 영향을 주지 않으면서 최대한 dUTP를 첨가할 수 있는 비율을 확인하였다. UsnRT-PCR 반응은 기존의 snRT-PCR 반응 전 단계에 UNG 처리 과정(50°C에서 5분)과 불활화 과정(95°C에서 5분)을 포함한 것 이외에는 동일한 조건으로 수행하였다.

### UsnRT-PCR의 핵산 교차오염 방지 효과

이전의 UsnRT-PCR에 의해 증폭된 DNA가 실험실 내에 오염되어 있음을 전제로 하여 UsnRT-PCR로 기 증폭된 DNA를 인위적으로 premix에 오염시킨 다음, 개발된 UsnRT-PCR을 실시하여 오증폭이 방지되는지를 확인하였다. 즉, UsnRT-PCR을 통하여 기 증폭된 DNA를 Nanodrop lite (Thermo Scientific, USA)로 정량한 다음, 20 ng/μL에서 2 fg/μL 농도로 10배수 단계 희석하였고, 이 희석액을 UNG를 적용한 UsnRT-PCR용 premix와 UNG를 적용하지 않은 snRT-PCR용 premix에 각각 첨가한 다음 동일한 조건으로 반응을 실시하여 PRRSV 특이 밴드 증폭 여부를 확인하였다.

### UsnRT-PCR의 특이도 및 민감도

개발 UsnRT-PCR의 특이도를 검증하기 위하여 공시 바이러스 8종으로부터 추출한 핵산을 template로 첨가하여 UsnRT-PCR을 실시하여 유전자 증폭 여부를 확인하였다. 개발 진단법의 민감도를 검증하기 위하여 유럽형 및 북미형 PRRSV 표준 주의 바이러스 역가를 Reed and Muench (1938)의 방법으로 측정하여  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL로 조정한 다음, PBS로 10배수 단계 희석하였으며, 각 희석액으로부터 추출한 핵산을 이용하여 RT-PCR, snRT-PCR 및 UsnRT-PCR을 실시하여 개발 진단법의 단계별 민감도를 확인하였으며, RRT-PCR (Kleiboeker 등, 2005)을 동시에 실시하여 PRRSV 유전형별 검출한계를 비교하였다.

### 야외시료에 대한 PRRSV 검출효율 비교

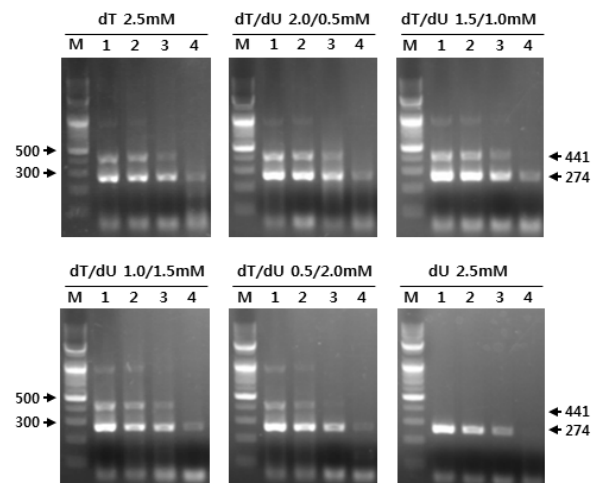
야외 시료에 대한 UsnRT-PCR의 효용성을 평가하기 위하여 PRRSV 감염 양돈장으로부터 경북대학교

실험실에 검사 의뢰되어 보관하고 있던 야외시료 110 점(혈청 60점, 폐장조직 50점)을 무작위로 추출한 다음, 개발 UsnRT-PCR과 RRT-PCR (Kleiboeker 등, 2005)을 실시하여 야외시료에 대한 PRRSV 검출 효율을 비교하였다. 2가지 진단법으로 모두 양성인 시료와 모두 음성인 경우는 제외하고, 양성 및 음성 결과 판독이 상이한 시료인 경우에는 해당 증폭 DNA를 염기서열 전문 분석회사(Bioneer, Dajeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석한 다음, 유럽형 및 북미형 PRRSV 표준주의 유전자 염기서열과 비교하여 상동성 여부를 확인하였다.

## 결 과

### UsnRT-PCR 조건 확립

UNG 전처리를 통하여 핵산오염을 방지할 수 있으면서도 UNG 비처리 snRT-PCR과 가장 유사한 증폭 효율을 가지는 UsnRT-PCR의 조건을 확립하기 위하여 최적의 dTTP/dUTP 조합을 탐색한 결과, dUTP만을 2.5 mM 첨가한 premix인 경우에는  $10^4 \sim 10^2$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL의 바이러스 역가에서는 PRRSV ORF 7 유전자 특이밴드(441 또는 274 bp)가 관찰되었으나  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL의 바이러스 역가에서는 특이밴드

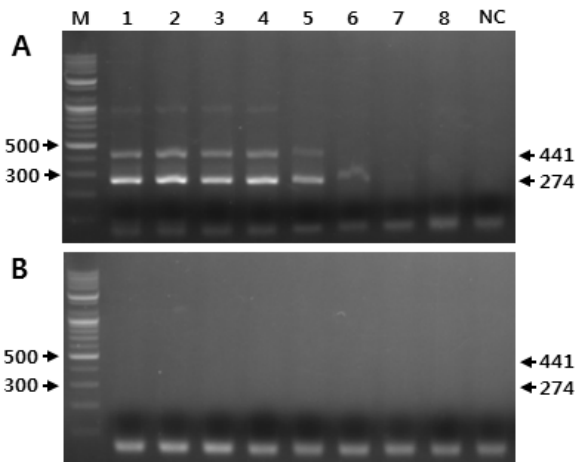


**Fig. 1.** Optimization of the proposed UNG-supplemented single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction (UsnRT-PCR) with different dTTP (dT) and dUTP (dU) concentration ratio. Lane M, 100 bp DNA marker; Lane 1~5, amplified DNAs by the UsnRT-PCR with RNAs extracted from 10-fold serially diluted NA-PRRSV (viral titers from  $10^4$  to  $10^1$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL).

가 증폭되지 않았다. dTTP만 첨가한 premix와 dTTP와 dUTP의 농도비를 달리하여 첨가한 premix인 경우에는  $10^4 \sim 10^1$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL의 바이러스 역가에서 모두 특이밴드가 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 증폭효율에 영향을 미치지 않으면서도 최대한 dUTP가 증폭 DNA 염기서열에 포함되도록 하기 위하여 premix에 포함되는 dTTP/dUTP의 비율을 0.5/2.0 mM으로 고정하여 이후의 실험을 진행하였다.

### UsnRT-PCR의 핵산 교차오염 방지 효과 확인

개발 UsnRT-PCR이 실제로 기증폭된 핵산의 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있는지 확인하기 위하여 UsnRT-PCR로 기증폭된 북미형 PRRSV의 DNA 희석액을 각 반응튜브에 혼입시켜 Usn-RT-PCR을 실시한 결과, UNG 처리과정을 적용하지 않은 snRT-PCR에서는 오염시킨 DNA 농도가 20 fg 이상인 경우 모두 PRRSV 유전자 특이 밴드(441 또는 274 bp)의 증폭이 확인되었으나(Fig. 2A) UNG 처리과정을 적용한 UsnRT-PCR에서는 혼입시킨 DNA의 양에 상관없이 특이 밴드의 증폭이 관찰되지 않았다(Fig. 2B). 따라서 개발된 UsnRT-PCR은 기증폭된 DNA가 20 ng 수준으로 오염되더라도 오증폭이 방지될 수 있음을 알 수 있었다.



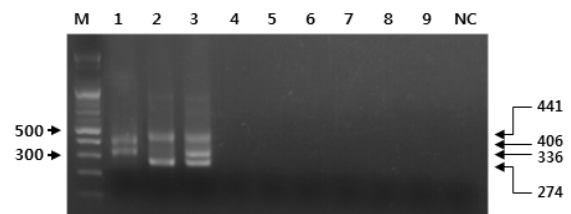
**Fig. 2.** Prevention effect for the DNA carryover contamination in the developed UNG-supplemented single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction (UsnRT-PCR). (A and B) snRT-PCR without UNG system and UsnRT-PCR with UNG system. Lane M, 100 bp DNA marker; Lane 1~8, snRT-PCR or UsnRT-PCR results that were carried out with pre-amplified DNA templates at the concentration of 20 ng–2 fg/ $\mu$ L, respectively.

### UsnRT-PCR의 특이도 및 민감도

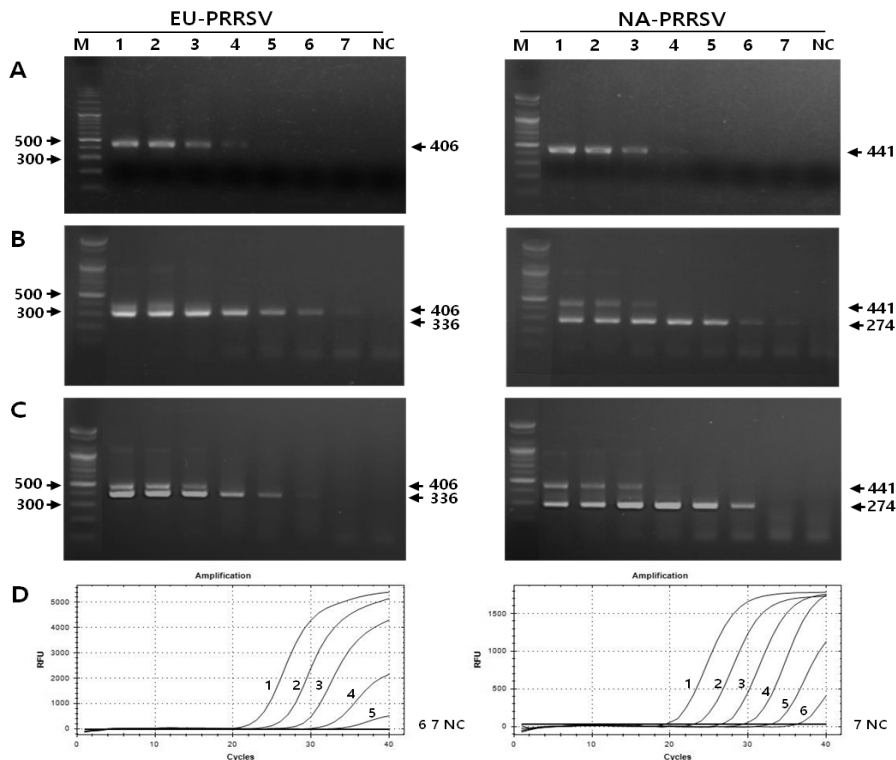
개발 UsnRT-PCR의 특이도를 확인하기 위하여 유럽형 및 북미형 PRRSV와 돼지에 감염되는 주요 바이러스성 질병 원인체 6종(2개 아형의 SIV, CSFV, PCV2 및 PPV)에서 추출한 핵산을 template로 하여 각각 UsnRT-PCR을 실시한 결과, 유럽형 및 북미형 PRRSV 이외 다른 병원체의 유전자를 증폭하지 않아 개발된 진단법이 PRRSV의 진단에 특이적으로 활용될 수 있음을 확인하였다(Fig. 3). 개발 UsnRT-PCR의 민감도를 확인하기 PRRSV의 역가별 희석액을 대상으로 RT-PCR, snRT-PCR, Usn-RT-PCR 및 RRT-PCR을 각각 실시하여 검출한계를 비교한 결과, 기 보고된 RRT-PCR (Kleiboeker 등, 2005)의 민감도는 유럽형 및 북미형 PRRSV에 대해 각각 1 TCID<sub>50</sub> 및 0.1 TCID<sub>50</sub>의 검출한계를 나타내어 개발자가 당초 제시한 민감도와 일치하였다(Fig. 4D). 개발 RT-PCR은 유럽형과 북미형 PRRSV 공히 10 TCID<sub>50</sub> 희석액까지 양성반응이 관찰되었으며(Fig. 4A), snRT-PCR인 경우, RT-PCR보다 3단계 더 높은 희석배수인 0.01 TCID<sub>50</sub>까지 양성밴드가 확인되었다(Fig. 4B). 반면에 UNG 처리과정을 적용한 UsnRT-PCR은 유럽형 및 북미형 공히 0.1 TCID<sub>50</sub> 수준의 검출한계를 나타내어 unRT-PCR에 비하여 10배 낮은 민감도를 나타내었으나 RRT-PCR의 민감도와는 유사한 수준으로 확인되었다(Fig. 4C).

### 야외시료에 대한 진단효율

야외 시료에 대한 110점(혈청 60점, 폐장조직 50점)으로부터 추출한 RNA를 대상으로 개발 UsnRT-PCR과 RRT-PCR을 실시하여 진단의 효용성을 평가한 결과, 개발 UsnRT-PCR는 110점의 야외시료에서 유럽



**Fig. 3.** Specificity of the UNG-supplemented single-tube nested reverse transcription-polymerase chain reaction. Lane M, 100 bp DNA marker; Lane 1, EU PRRSV; Lane 2, NA-PRRSV; Lane 3, EU- and NA PRRSV; Lane 4, SIV (H1N2); Lane 5, SIV (H3N2); Lane 6, CSFV; Lane 7, PPV; Lane 8, PCV2; Lane NC, negative control.



**Fig. 4.** Comparison of sensitivities among reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR, A), single-tube nested RT-PCR (snRT-PCR, B), UNG-supplemented snRT-PCR (C) and real time RT-PCR (D) for the detection of EU-PRRSV (left) and NA-PRRSV (right). Lane M, 100 bp DNA marker; Lane 1~7, Results of each assays with RNAs extracted from 10-fold serially diluted NA-PRRSV (viral titers from  $10^4$  to  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL).

형 PRRSV 단독감염 28점, 북미형 PRRSV 단독감염 38점 및 유럽형/북미형 PRRSV 혼합 11점 등 총 77점에서 양성반응을 나타내었으며, 33점에서 음성반응을 나타내어 70% (77/110)의 검출율을 나타내었다. 반면에 RRT-PCR은 유럽형 PRRSV 단독감염 26점, 북미형 PRRSV 단독감염 38점 및 유럽형 및 북미형 PRRSV 혼합 12점 등 총 76점에서 양성반응을 나타내었으며, 34점에서 음성반응을 나타내어 69.1% (76/110)의 검출율을 나타내어 개발 UsnRT-PCR이 기보고된 RRT-PCR에 비해 검출율이 다소 높은 것으로 확인되었다(Table 2). 시료별 검사결과를 세부적으로 분석해보면 RRT-PCR에서 유럽형 PRRSV 양성인 시료 26점 중에서 1점이 UsnRT-PCR로는 음성으로 판정되었고, RRT-PCR에서 북미형 PRRSV 양성인 시료 38점 중에서 2점 및 1점이 UsnRT-PCR로는 각각 북미형/유럽형 양성 및 음성으로 판정되었으며, RRT-PCR에서 유럽형/북미형 양성인 시료 12점 중에서 3점이 UsnRT-PCR로는 유럽형 1점, 북미형 1점 및 음성 1점으로 판정되어 두 시험법간 세부적인 진단결과에서는 일부 상이한 결과가 도출되었다. 또한 RRT-PCR에서 음성인 시료 34점 중 4점이 UsnRT-PCR로는 유럽형(2점) 및 북미형(2점)으로 양성 판정되어 RRT-PCR로 검출하지 못하는 일부 시료에서

UsnRT-PCR로는 PRRSV 유전자가 확인되었다. 역으로 개발 UsnRT-PCR로 유럽형, 북미형 또는 유럽형/북미형 양성인 시료 4점이 RRT-PCR과 진단결과가 상이하게 나타났으며, UsnRT-PCR로 음성인 시료 33점 중 3점이 RRT-PCR에서 양성으로 판정되었다. 이러한 결과들을 종합할 때 개발 UsnRT-PCR의 기존 RRT-PCR에 대한 진단 일치율은 93.6% (103/110)이었으며, 양성일치율(96.1%)에 비하여 음성일치율(90.9%)이 비교적 낮은 것으로 분석되었다(Table 2). RRT-PCR 양성/UsnRT-PCR 음성인 시료 3점과 UsnRT-PCR 양성/RRT-PCR 음성인 시료 4점에 대하여 증폭된 DNA 단편에 대한 염기서열을 분석하여 표준주의 염기서열과 비교한 결과(자료 미제시), 모두 PRRSV 표준주의 해당 염기서열 부위와 일치하여 해당시료에 대한 두 진단법간의 검출결과의 차이는 시료내 바이러스 유전자의 변이 때문이 아니라 두 진단법간의 검출방식이나 진단효율의 차이에 기인한 것으로 추정되었다.

## 고 찰

nRT-PCR기법은 외부 primer set를 이용한 1차 RT-PCR을 통하여 1차 증폭된 DNA를 내부 primer set를

이용하여 2차 nPCR을 실시하여 재증폭하기 때문에 nPCR 과정이 없는 일반 RT-PCR에 비하여 특이도와 민감도가 높아 PRRSV의 유전자진단법으로서 유용하게 활용되어 왔다(Christopher-Hennings 등, 1995; Gilbert 등, 1997; Kono 등, 1996; Shin 등, 1998). 그러나 기 보고된 nRT-PCR은 3단계(RT, PCR 및 nPCR) 또는 2 단계(RT-PCR 및 nPCR)의 반응과정을 구분하여 수행하기 때문에 전단계의 반응산물을 다음 단계로 옮기거나 추가적으로 필요한 시약을 첨가하기 위하여 반응튜브를 개봉해야 한다. 이러한 과정에서 대량으로 증폭된 DNA가 실험실 환경이나 기구 등을 오염시키게 되며, 특히 일상적으로 PCR 검사를 수행하는 진단실험실에서는 이러한 기 증폭 DNA의 교차오염에 의한 오증폭 즉 위양성 반응이 큰 문제점으로 지적되어 왔다(Persing, 1990; Kwok과 Higuchi, 1989). 이와 같이 여러 단계의 반응을 거치면서 발생하는 교차오염 문제는 반응단계를 단순화하여 1개의 반응튜브 내에서 반응시약의 추가과정 없이 1차 RT-PCR과 2차 nPCR을 연속적으로 수행하는 one-step nRT-PCR 기법을 적용함으로써 해결할 수 있다(Abath 등, 2002; Rolfes 등, 1992). 그러나 저자들이 알기로는 PRRSV 진단용으로 개발된 nRT-PCR 중에서는 아직까지 단일튜브에서 1차 RT-PCR과 2차 nPCR을 연속적으로 수행할 수 있는 one-step snRT-PCR은 개발된 적이 없다. 따라서 이 연구에서는 단일 반응튜브 내에서 1차 RT-PCR과 2차 nPCR을 연속적으로 수행함으로써 여러 반응단계를 거치는 기존 nRT-PCR의 교차오염 문제를 해결하는 동시에 유럽형과 북미형의 PRRSV를 특이적으로 감별진단할 수 있는 snRT-PCR기법을 개발하였다.

한편, 여러 반응 단계를 단순화하여 반응튜브의 개봉에 따른 핵산의 교차오염 문제를 해결하더라도 증폭산물의 전기영동 확인과정 등 기증폭된 DNA가 오염될 수 있는 경로는 다양하므로 기증폭된 DNA 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있는 또 다른 대책이 필요하다(Aslanzadeh, 2004; Kwok과 Higuchi, 1989; Persing, 1990). 이러한 기증폭된 DNA의 교차오염에 의한 오증폭 문제를 해결하기 위하여 다양한 방법들이 제시되어져 왔으나 UNG 시스템을 이용한 핵산 교차오염 방지전략이 가장 현실적인 대안으로 평가 받아왔으며, 실제 사람의 influenza virus (Poddar 등, 1997) 및 coxsackievirus (Pang 등, 1992) 그리고 국내 수의분야에서도 돼지췌코바이러스(Kim 등, 2014)의 진단에 성공적으로 적용된 바 있다. 따라서 이 연구

에서는 개발된 snRT-PCR에 UNG 처리기법을 도입한 UsnRT-PCR용 premix를 이용하여 PRRSV의 유전자를 증폭한 다음, 기증폭된 DNA를 농도별로 혼입시킨 후 개발 snRT-PCR과 UsnRT-PCR을 각각 실시한 결과, snRT-PCR과는 달리 UsnRT-PCR에서는 20 ng 농도의 기증폭된 DNA를 오염시킨 경우에도 완전히 오염 DNA에 의한 오증폭이 방지됨이 확인되었다(Fig. 2). 이와 같이 개발 UsnRT-PCR은 기존 2~3단계의 nRT-PCR의 반응과정을 1단계로 단순화하였고, 만약에 있을 수 있는 기증폭된 DNA의 교차오염에 의한 오증폭까지도 UNG 처리로 방지할 수 있기 때문에 일선 진단실험실에서 이를 활용할 경우 PRRSV 진단의 신뢰도를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

dUTP와 UNG를 이용한 핵산오염 방지대책은 기증폭된 DNA의 교차오염을 사전에 차단할 수 있기 때문에 PCR 진단의 신뢰도를 확보할 수 있지만 기존의 UNG 비처리 PCR에 비하여 진단의 민감도가 저하될 수 있다(Kim 등, 2014; Longo 등, 1990). 따라서 유럽형 및 북미형 PRRSV 희석액으로부터 추출한 RNA를 이용하여 개발 UsnRT-PCR과 UsnRT-PCR 개발 과정과 연관된 RT-PCR 및 snRT-PCR, 그리고 RRT-PCR (Kleiboeker 등, 2005)을 각각 실시하여 검출 민감도를 비교하였다. 그 결과, 1차 RT-PCR의 민감도(10 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL)에 비하여 2차 nPCR을 접목한 snRT-PCR의 민감도(0.01 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL)는 약 1,000배 이상 향상되었으나 UNG 시스템을 적용한 UsnRT-PCR의 민감도(0.1 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL)는 snRT-PCR에 비하여 약 10배 감소됨이 확인되었다. 그러나 UsnRT-PCR의 민감도를 RRT-PCR의 민감도(0.1~1 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL)와 유사한 수준이었으며, 기 보고된 다른 연구자들의 nRT-PCR의 민감도(1~10 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL)보다 10배 이상 우수한 것으로 PRRSV의 일상 진단법으로 이용하기에는 충분한 것으로 판단되었다(Christopher-Hennings 등, 1995; Gilbert 등, 1997; Kono 등, 1996; Shin 등, 1998).

개발 UsnRT-PCR의 야외시료에 대한 효용성을 평가하기 위하여 야외 시료 110점을 대상으로 개발 UsnRT-PCR과 기보고된 RRT-PCR을 실시하여 그 결과를 비교한 결과, 두 진단법의 검출율은 각각 70% 및 69.1%)로 유사하였으나 RRT-PCR 대비 개발 UsnRT-PCR의 진단 일치율은 93.6%로 개발 UsnRT-PCR의 검출율이 다소 높았다(Table 2). 그러나 RRT-PCR 대비 개발 UsnRT-PCR의 양성 및 음성 일치율은 각각 96.1% 및 90.9%로 음성 일치율이 다소 낮게 평가되



어 세부적인 진단결과를 분석한 결과, 두 진단법에 의해 모두 양성으로 판정되었지만 PRRSV의 유전형 판정결과가 다른 경우가 4건 확인되었으며, 두 진단법간의 양성/음성 판정결과가 상이한 경우는 7건이 확인되었다(Table 2). 이러한 차이가 해당 시료에 감염된 PRRSV의 유전자 염기서열과 진단법에 사용된 primer 및 probe의 염기서열간의 불일치에 기인할 수 있으므로(Indik 등, 2005) 이를 확인하기 위하여 해당 시료 7건에서 증폭된 DNA에 대한 염기서열 분석을 실시하여 확인한 결과, 해당 표준주와 유전자염기서열이 모두 일치하여 이러한 두 진단법간 상이한 진단결과가 검사시료 내 PRRSV의 유전적 변이에 기인한 것은 아닌 것으로 판단되었다. 따라서 야외 시료에 대한 두 진단법간의 민감도의 차이, 검사시료 내 PCR 저해인자의 존재 또는 primer 방식의 RT-PCR과 probe 방식의 RRT-PCR간 검출방식의 차이 등이 다양한 요인이 작용할 수 있다고 생각되나 향후 추가적인 분석이 필요할 것으로 생각된다. 유사한 수준의 민감도를 가지는 두 유전자진단법을 야외 시료에 대해 적용하였을 때 개별 시료에 대한 진단 결과가 일부 상이할 수 있다는 것은 일상적인 PRRSV 진단을 수행하는 실험실에서 중요하게 고려해야 할 사안으로 생각된다. 예를 들어 일상적인 양돈장 모니터링 수준이 아니라 특정 시료에 대한 양성/음성 판정 결과나 PRRSV 유전형 판정결과가 해당 양돈장의 방역상황 파악과 방역대책 수립에 결정적인 영향을 미칠 수 있는 경우도 있기 때문이다. 따라서 PRRSV의 진단에 유전자진단법을 활용하는 진단실험실에서는 RT-PCR이나 RRT-PCR 중 하나의 진단법만 활용하기보다는 2개의 진단법을 채택하여 진단시료의 성격에 따라 상호보완적으로 활용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

## 결 론

PRRSV 방제전략의 성공을 위해서는 신뢰도가 높은 PRRSV 유전형 감별진단법의 적용이 필수적이다. 이 연구에서는 단일 반응튜브에서 1차 RT-PCR과 2차 nPCR을 연속적으로 수행할 수 있는 있으며, uracil DNA glycosylase (UNG) 시스템을 적용하여 증폭된 DNA의 교차 오염을 방지할 수 있는 UNG supplemented single-tube nRT-PCR (UsnRT-PCR)을 개발하여 그 효용성을 평가하였다. 개발 UsnRT-PCR은 이전의

UsnRT-PCR로 증폭된 PRRSV ORF 7 유전자의 오염에 의한 오증폭을 방지할 수 있는 것으로 확인되었다. 개발 진단법은 유럽형 및 북미형의 PRRSV를 특이적으로 감별진단할 수 있었으며, 민감도는 기 보고된 real time RT-PCR (RRT-PCR)과 유사한 0.1 TCID<sub>50</sub>로 평가되었다. 야외시료 110점(혈청 60점, 폐장조직 50점)를 대상으로 개발 UsnRT-PCR과 RRT-PCR을 실시한 결과, 검출율은 각각 70% (77/110) 및 69.1% (76/110)로 개발 UsnRT-PCR이 다소 높았다. 개발 UsnRT-PCR의 RRT-PCR에 대한 양성 및 음성 일치율은 96.1% (73/76) 및 90.9% (30/33)로 분석되어 일부 야외시료에서 검사결과가 상이하게 나타났다. 따라서 일선 진단실에서는 중요한 시료에 대해서는 정확한 진단을 위하여 2가지 진단법을 병행할 필요가 있다고 생각된다. 이 연구를 통하여 개발된 UsnRT-PCR은 높은 민감도와 특이도를 가지면서도 검사과정 중 핵산 오염에 의한 오진을 방지할 수 있기 때문에 일선 진단실험실에서 PRRSV 진단에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 논문은 농림축산식품부, 농림축산검역본부 학술연구용역과제(과제번호: Z-1543069-2014-14-02) 및 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(세부과제번호: PJ00181601)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Abath FGC, Melo FL, Werkhauser RP, Montenegro L, Montenegro R and Schindler HC. 2002. Single-tube nested PCR using immobilizing internal primers. *Biotechniques* 33: 1210-1214.
- Albina E. 1997. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol* 55: 309-316.
- Aslanzadeh J. 2004. Preventing PCR Amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory. *Annals Clin Lab Sci* 34: 389-396.
- Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CC. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 1730-1734.
- Corzo CA, Mondaca E, Wayne S, Torremorell M, Dee S, Davies

- P, Morrison RB. 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154: 185-192.
- Gilbert SA, Laroche R, Magar R, Cho HJ, Deregat D. 1997. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 35: 264-267.
- Haff LA. 1994. Improved quantitative PCR using nested PCR. *PCR methods applic* 3: 332-337.
- Indik S, Schmoll F, Sipos W, Klein D. 2005. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Vet Microbiol* 107: 171-178.
- Keffaber KK. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Pract Newslett* 1: 1-9.
- Kim EM, Park CK. 2014. UNG-based direct polymerase chain reaction (udPCR) for the detection of porcine circovirus 2 (PCV2). *Korean J Vet Serv* 37: 253-261.
- Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, Joo HS, Frey ML. 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133: 477-483.
- Kim SH, Roh S, Choi EJ, Lee C, Lee CH, Lee KH, Lee KK, Song YK, Lee OS, Park CK. 2010. A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet Microbiol* 143: 394-400.
- Kleiboeker SB, Schommer SK, Lee SM, Watkins S, Chittick W, Polson D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *J Vet Diagn Invest* 17: 165-170.
- Kono Y, Kanno T, Shimizu M, Yamada S, Ohashi S, Nakamine M, Shirai J. 1996. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *J Vet Med Sci* 58: 941-946.
- Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature (London)* 339: 237-238.
- Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. 1997. Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 58: 127-133.
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93: 125-128.
- Murtaugh MP, Stadejek T, Abrahante JE, Lam TTY, Leung FCC. 2010. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154: 18-30.
- Nuemann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, Mabry JW, Bush EJ, Seitzinger AH, Green AL, Zimmerman JJ. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 227: 385-392.
- Pang J, Modlin J, Yolken R. 1992. Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. *Mol Cel Probes* 6: 251-256.
- Persing DH. 1990. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 29: 1281-1285.
- Poddar SK, Sawyer MH and Connor JD. 1997. Optimized PCR amplification of influenza A virus RNA using Tth DNA polymerase, incorporating uracil N glycosylase (UNG) in a single tube reaction. *J Clin Lab Anal* 11: 323-327.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am J Hyg* 27: 709-716.
- Rolfs A, Scholler I, Finckh U, Rolfs JW. 1992. General applications of PCR. In: Rolfs, A. (ed) *PCR: clinical diagnostics and research*. Springer-Verlag, Berlin, pp 34-50.
- Shi M, Lam TTY, Hon CC, Hui RKH, Faaberg KS, Wennblom T, Murtaugh MP, Stadejek T, Leung FCC. 2010. Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res* 154: 7-17.
- Shin J, Bautista EM, Kang YB, Molitor TW. 1998. Quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA in semen by single-tube reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 72: 67-69.
- Thanawongnuwech R, Suradhat S. 2010. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Res* 154: 133-140.
- Wensvoort G, Tepstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zestra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van Veld P, Groenland GJR, van Gennep JA, Voetsd MTH, Verheijdene JHM, Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 13: 121-130.